云 南 植 物 研 究 1998，20（4）：459～463
Acta Botanica Yunnanica

枳壳外植体离体再生及农杆菌介导的遗传转化*

贺 红[1**] 潘瑞炽[1] 韩美丽[2] 李耿光[2]
（1 华南师范大学生物系，广州 510631）
（2 中国科学院华南植物研究所，广州 510650）

摘要 以枳壳（*Poncirus trifoliata* Raf.）实生苗的上胚轴及茎段为材料，在附加有 BA 和 MT 培养基上进行培养，上胚轴出芽率普遍高于茎段，BA 为 1 mg/L 时，出芽率最高（86.0%），BA 浓度升高，出芽率随之下降。外植体在培养基上的接种方式，对出芽有一定影响，上胚轴切段以形态学下端垂直插入，出芽率高。枳壳上胚轴进行遗传转化，卡那霉素作为选择试剂，浓度为 50 mg/L。抑菌剂的使用，以头孢霉素较好，不仅杀菌效果好，且对外植体出芽无明显抑制作用。外植体与农杆菌共培养后，在含卡那霉素的培养基上，抗性芽发生率为 14.2%，GUS 基因表达检测结果，抗性植株中，GUS 反应呈阳性所占比例为 70.0%。

关键词 枳壳，外植体，离体培养，遗传转化
分类号 Q 943，Q 945

In Vitro Culture of Explants and the Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of *Poncirus trifoliata*

HE Hong[1] PAN Rui-Chi[1] HAN Mei-Li[2] LI Geng-Guang[2]
（1 *Department of Biology*, *South China Normal University*, Guangzhou 510631）
（2 *South China Institute of Botany*, *The Chinese Academy of Sciences*, Guangzhou 510650）

Abstract Epicotyls and stem segments from sterile seeding of *Poncirus trifoliata* Raf. Were cultured *in vitro*. The results indicated that epicotyls were suitable for culture *in vitro*, BA at a concentration of 1 mg/L gave the highest shoot formation frequency (86.0%). As BA concentrations increased, the ability of shoot formation decreased. Epicotyls oriented with their apical ends protruding from the medium produced more shoots than when they were placed with their basal end upright or were placed horizontally. Explants used for transformation were the epicotyls from *Pqncirus trifoliata* Raf. The selection pressure for kanamycin was 50mg/L. Ceftaxime used as antibiotics was better than carbenicillin. After 1.5 months 14.2% resistant shoots were emerged from the explants. Histochemical GUS assay showed that 70.0% of the resistant plants were GUS-positive.

Key words *Poncirus trifoliata*, Explants, *in vitro* culture, Genetic transformation

在柑桔生产中，枳壳是一种优良的砧木，通常是实生播种繁育的，其繁殖率低，且出

---

* 本研究承香港 Croucherad 基金资助
** 作者现工作单位：广州中医药大学中药研究所，邮编 510407
1998－02－19 收稿，1998－05－18 接受发表

苗不整齐，利用组织培养进行快速繁殖可克服常规方法的缺点。同时，目前影响柑桔产量和品质的主要因素之一，是病虫害的危害，解决这一问题的根本途径是抗病虫新品种的选育。遗传转化技术是近年来兴起的一项新型生物育种技术，前人在甜橙、宽皮桔及贡柑等方面已做了部分工作（Pena *et al*，1995；高峰，1993；余焰华等，1992；Moore *et al*，1992；高峰等，1990），但对于枳壳的遗传转化，国内还未见报道。本文以枳壳上胚轴、茎段为材料，研究了离体再生的过程，并初步建立了一套根癌农杆菌介导的外源基因转入方法。

1 材料与方法

植物材料：枳壳种子经表面消毒培养无菌苗，当苗长至一定大小时，采取上胚轴及茎段，切成约 1 cm 长的小段，用于离体培养。

离体培养：以 MT 为基本培养基，根据试验要求附加不同浓度的 BA、NAA，每天光照 16 h，培养温度为 26±1℃。

细菌菌株与质粒：农杆菌菌株为 EHA101，含有质粒载体 pGA482GG，质粒上插入了 GUS、NPTⅡ基因。

农杆菌培养：农杆菌划线培养在含有 50 mg/L 卡那霉素的 YEP 培养基上，28℃黑暗培养，待长出菌落后，挑取单菌落接于 YEP 液体培养基上，28℃振荡 20～25 h，达到菌对数生长期，OD=0.8～1，培养物即可用于感染。

外植体的转化：将枳壳上胚轴切段浸入到准备好的菌液中 20 min，随后转到无菌滤纸上以吸掉多余的菌液，将外植体接种于不含卡那霉素（Kanamycin，Km）及头孢霉素（Cefotaxime，Cx）的 MT 培养基上共培养 3d 后，再转到含 Km 50 mg/L 和 Cx 300 mg/L 的选择培养基上，每两周更换一次培养基，诱导抗性芽的产生。

组织化学法检测 GUS 活性：共培养后，取部分外植体小块检测 GUS 基因的瞬时表达活性，于 5 个月后对获得的抗性植株叶片、茎段及根尖进行 GUS 基因稳定表达的活性检测。GUS 组织化学染色法参见傅荣昭等（1994）。

2 结果与讨论

2.1 BA 浓度对外植体形成芽的影响

通过实验，发现 MT 基本培养基附加 BA 有利于枳壳多种外植体不定芽的发生，现以上胚轴、茎段为材料，设置不同的 BA 浓度进行试验。

外植体接种一周左右，培养的组织开始膨大，2 周后陆续形成芽。从表 1 可知，BA 为 1 mg/L 时，上胚轴出芽率达 86.0%，随着 BA 浓度的升高，出芽率随之下降，但附加 BA 的所有处理，出芽率均高于对照，说明 BA 对上胚轴不定芽的发生具有较高的促进作用。茎段培养中，不加 BA 的 MT 培养基（对照）的出芽率为 45.5%，低浓度的 BA（1 mg/L）有一定促进作用，出芽率为 65.2%，但 BA 浓度继续升高，表现较强的抑制作用，出芽率低于对照。因此，枳壳在进行无性系快速繁殖及遗传转化时，无菌苗的上胚轴是较好的材料。张进仁等（1985）曾以枳胚珠为材料进行培养，诱导胚状体，进而繁殖砧木苗。本文以枳壳外植体直接诱导不定芽，其再生过程简单快捷，为快速繁殖提供了一种有效途径，同时也为遗传转化建立了一种直接、高效的组织培养植株再生体系。

表 1　不同 BA 浓度对上胚轴及茎段形成芽的影响

Table 1　Effect of BA concentration on shoot formation cultured by epicotyls and stem segments

浓　度 Concentration (mg/L)	上胚轴　Epicotyl		茎段　Stem segments	
	外植体数（块） No. of segments	出芽率（%） Frequency	外植体数（块） No. of segments	出芽率（%） Frequency
0	51	23.5	55	45.5
1	50	86.0	46	65.2
2	52	71.2	50	40.0
3	48	66.7	50	20.0
4	49	49.0	48	10.4

2.2　外植体在培养基中放置方式对形成芽的影响

以枳壳上胚轴为材料，采用 3 种接种方式：形态学下端垂直插入；形态学上端朝下垂直插入；外植体水平放置。培养基为 MT + BA1 mg/L。结果表明，出芽率以形态学下端下插最高，形态学上端下插外植体在培养 1 个月时，出芽水平极低，仅为 20.2%，随着培养时间的延长，形态学上端下插与水平放置的外植体，出芽率有较大的升高，尤以前者表现明显，培养 1.5 个月后，均能达 65%以上，说明这些外植体培养时，短期内，出芽情况与生长素极性运输有关，如时间长则生长素慢慢会调节再分配，表现前期出芽速度慢。

表 2　外植体在培养基中放置方式对形成芽的影响

Table 2　Effect of explant posture orientation in medium on shoot formation frequency

外植体放置方式 Posture orientation of explants	接种 30 d 出芽率 At 30 d（%）	接种 45 d 出芽率 At 45 d（%）
形态学下端下插 Apical end of the segment protruding	84.5	88.0
形态学上端下插 Basal end of the segment protruding	20.2	65.3
水平放置 Horizontal	54.5	75.6

2.3　无根苗诱导生根

枳壳外植体培养形成芽，长出数片真叶后，从外植体上切下，转入含有生长素的生根培养基上，一般转管后 1 个月左右可以形成根，获得完整植株。试验结果表明，以 MT 基本培养基附加 NAA 0.5 ~ 1 mg/L，效果较好，不仅生根率高，且保证上部茎叶生长旺盛；在不含 NAA 的 MT 培养基上，亦能诱导生根，但生根率低；而 NAA 浓度继续升高，根的生长过于旺盛，产生簇状根，从而抑制上部茎叶的生长。

2.4　合适选择试剂的确定

现有的成功转化报道中，卡那霉素是利用最多的一种选择性试剂，本试验也以卡那霉素作为选择试剂，以筛选抗性芽的产生。现以枳壳上胚轴为材料，观察了不同浓度的卡那霉素对出芽的影响，外植体在培养基中的放置方式分两种：平放、竖放（以形态学下端朝下垂直插入）。1 个月后统计结果，见表 3。在无 Km 的对照中，出芽率较高。Km 处理中，

平放时，Km 25 mg/L，仅个别外植体有芽形成，当Km增加至50 mg/L以上时，所有外植体均无芽形成，外植体逐渐变白。因此，平放外植体以Km 50 mg/L作为常用的选择水平。外植体竖放时，Km 50 mg/L时，仍有50%以上的出芽率，随着Km浓度升高，白芽数增加，Km升至125 mg/L时，仍有部分出芽。说明竖放外植体，对Km的抗性增加，这可能因为竖放时，外植体只一端接触培养基；而平放时，外植体与培养基充分接触，低浓度的Km就表现强的抑制作用。因此下面的转化试验，外植体选择培养均采用平放方式，以减少假抗性芽的产生，平放的外植体在培养前期出芽率较低，随着培养时间延长，出芽数也较高，因此对转化效率无太大影响。

表3 不同浓度卡那霉素对芽形成的影响

Table 3 Effect of kanamycin concentration on shoot formation

外植体放置方式 Posture orientation of explants	卡那霉素浓度（mg/L） Km concentration	出芽率（%） Frequency of shoot formation
水平放置	0	61.2
Horizontal	25	4.2
	50	0
	75	0
形态学下端下插	0	86.4
Apical end of the segment protruding	50	54.3
	100	40.6
	125	15.4

2.5 羧苄青霉素和头孢霉素对芽形成的影响

在用农杆菌转化植物细胞时，常用羧苄青霉素和头孢霉素抑制农杆菌的过量生长。程振东等（1994）在用根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化中，发现两者除了抑制农杆菌的生长外，还影响植物的生长发育，头孢霉素易于引起伤口细胞褐化死亡，抑制芽的分化；而羧苄青霉素促进芽分化，抑制生根。我们的试验结果表明，两种抗菌素在浓度为500 mg/L时，对外植体出芽均无明显影响。抑菌试验中，300 mg/L的头孢霉素能完全抑制农杆菌的生长，而相同的浓度的羧苄青霉素杀菌效果不太好，农杆菌仍少量生长。因此，以下转化试验，抗菌素均采用头孢霉素，浓度为300 mg/L。

2.6 根癌农杆菌感染和抗性植株再生

枳壳上胚轴切段与农杆菌共培养3 d后，转至附加300 mg/L头孢霉素和50 mg/L卡那霉素的选择培养基中进行培养。处理后，出芽过程被延缓，1个多月后才可看到抗性芽的产生。表4中，枳壳未经感染的外植体（对照）未分化出芽，经感染后，14.2%的外植体分化出芽。以上是感染1.5个月的统计结果。随后，每过两周更换一次培养基，随着选择次数增加，部分再生芽变白、死亡。待芽长至2 cm左右，从外植体上切下诱导生根，生根培养基为MT + NAA 1mg/L。

表4　根癌农杆菌感染的外植体再生芽情况

Table 4　Induction of shoot from explants infected by *Agrobacterium tumefaciens*

外植体数（块） No. of explants	产生绿芽外植体数（块） No. of explants with green shoots	转化再生频率（%） Frequency of shoot regeneration
对照 Control 148	0	0
处理 Treated 528	75	14.2

2.7 GUS基因表达检测

共培养3d后进行GUS基因瞬时表达活性的检测，取部分外植体进行GUS检测，发现80.0%的外植体，在切口处细胞中可测到GUS活性，显蓝色，没有经转化处理的对照无任何蓝色反应。

GUS基因稳定表达的活性检测于5个月后进行。转化处理获得的抗性植株检测结果，70.0%的植株呈阳性反应，蓝色反应有强有弱，这是茎段染色的结果，又取其叶片进行GUS染色，大多数呈阳性反应，少数不显蓝色，说明有些植物已有稳定的GUS基因表达，也有些植株可能是嵌合的转化体。

参　考　文　献

张进仁，吴安仁，高峰，1985．枳胚珠的离体繁殖．中国柑桔，(1)：22～23

余焰华，郭惠珊，邹韵霞等，1992．外源基因导人贡柑体胚及其人工种子构建的初步研究．中山大学学报（自然科学版），**31** (1)：79～85

高峰，华学军，范云六等，1990．用根癌农杆菌离体转化柑桔．中国柑桔，**19** (4)：3～4

高峰，1993．甜橙不定芽的高频率诱导及其离体遗传转化．园艺作物品种国际学术讨论会论文集，北京：中国农业科学出版社，31～33

傅荣昭，孙勇如，贾士荣主编，1994．植物遗传转化技术手册．北京：中国科学技术出版社，168～170

程振东，卫志明，许智宏，1994．根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生．植物学报，**36** (9)：657～663

Moore G A, Jacono C C, Neidigh J L *et al*, 1992. Agrobacterium-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, **11**: 238～242

Pena L, Cervera M, Juarez J *et al*, 1995. Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, **14**: 616～619